

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860520

研究課題名(和文) がん幹細胞を標的とした糖鎖連結クロリンによる新規光線力学的療法のメカニズムの解明

研究課題名(英文) The mechanism of new photodynamic therapy targeting cancer stem cell with glycoconjugated chlorin

研究代表者

田中 守 (TANAKA, Mamoru)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：80617861

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：光線力学的療法(Photodynamic Therapy, PDT)は、光感受性物質が選択的に集積した腫瘍組織にレーザー光を照射し腫瘍細胞を選択的に破壊する治療法である。糖鎖連結クロリンは、癌細胞が糖を取り込む性質を利用した光感受性物質である。近年、癌細胞がWarburg効果を介してアポトーシスを回避することと、がん幹細胞が存在するメカニズムの関連が注目されている。本研究では、従来の抗癌剤などに対して抵抗性を持ち、再発や転移の起点と考えられている、がん幹細胞における糖代謝メカニズムの解明を行う事により、その機構を標的とした癌の根治という理想的な癌治療の確立を目指す。

研究成果の概要(英文)：Photodynamic therapy (PDT) consists of the administration of a photosensitizer together with visible light irradiation at a specific wavelength to activate the photosensitizer, leading to the conversion of molecular oxygen to various highly reactive oxygen species (ROS), which either kill tumor cells directly or damage the tumor-associated vasculature. G-chlorin (glycoconjugated chlorin; glucose-linked tetra (fluorophenyl) chlorin) has been developed as a new type of photosensitizer. In the current study, we show that PDT with a new photosensitizer, G-chlorin

研究分野：消化器内科

キーワード：Photodynamic therapy Concert Stem Cell c-Myc Glut1

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えるわが国において低侵襲な癌治療法の開発が望まれるが、この観点から注目を集めているのが光線力学的療法(Photodynamic Therapy, PDT)である。PDTとは、腫瘍親和性光感受性物質が癌細胞や腫瘍血管に特異的に集積する特性を利用し、光感受性物質の集積した癌組織に特定波長の光線を照射し、一重項酸素などの活性酸素の惹起で癌細胞のみを選択的に破壊する治療法である。抗癌剤耐性を示すがん幹細胞にも有効な新たな治療戦略としてPDTは注目され、消化管粘膜に局限した癌のみならず膵癌、癌性腹膜炎、肝癌などへの応用も始まり、とくに肝癌に対しては米国で第III相臨床試験が進行中である。

腫瘍細胞が高效率に糖を細胞内に取り込む事象は Warburg 効果として知られ PET 検査に応用されている。生体適合性分子である「糖」を光感受性物質のクロリンに連結した糖鎖連結クロリンは、腫瘍細胞への高選択的な取り込みを可能にした世界初の癌細胞標的感光医薬である。これまでの我々の実験で現在実臨床で使用されているレザフィリン®に比べ約 50 倍の殺細胞効果をもち、ヒト大腸癌細胞のヌードマウス皮下移植モデルで、皮下に存在する腫瘍に対する単回照射にもかかわらず、周囲組織へのダメージをほとんど伴わずに強力な腫瘍縮小効果を認めている(Tanaka M., et al. *Anticancer Res* 2011; 31 (3):763-9)。

近年、癌細胞がミトコンドリアを不活性化して細胞死を防ぐことが明らかになるなど、癌細胞が Warburg 効果を介してアポトーシスを回避することと、がん幹細胞が存在するメカニズムの関連が注目されている(*Cancer Res.* 2012 15:72 (6):1438-48)。

2. 研究の目的

光線力学的療法 (Photodynamic Therapy, PDT) は、光感受性物質が選択的に集積した腫瘍組織にレーザー光を照射し腫瘍細胞を選択的に破壊する治療法である。糖鎖連結クロリンは、癌細胞が糖を取り込む性質を利用した光感受性物質である。近年、癌細胞が Warburg 効果を介してアポトーシスを回避することと、がん幹細胞が存在するメカニズムの関連が注目されている。本研究では、従来の抗癌剤などに対して抵抗性を持ち、再発や転移の起点と考えられている、がん幹細胞における糖代謝メカニズムの解明を行う事により、その機構を標的とした癌の根治という理想的な癌治療の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 糖鎖連結クロリンの合成、精製

クロリン 1 分子に 4 個のグルコースを結合させ合成する(Hirohara S., et al. *J Photochem Photobiol B.* 2009 Oct

6:97(1):22-33)。

(2) がん幹細胞の分収

ヒト大腸癌細胞株である HT29, HCT116, ヒト胃癌細胞株である MKN45, NUGC4 を用いて、がん幹細胞を比較的多く含む分画で豊富に発現しているタンパクとして知られている CD133, CD44 (Lucia Ricci-Vitiani, et al. *Nature.* 2007; 445 (4):111-5)。Anti-CD133, Anti-CD44 (Miltenyi Biotec, Tokyo, Japan) により FACS Aria (BD Biosciences) でがん幹細胞を分収する。

(3) 糖鎖連結クロリンのがん幹細胞内取り込みのメカニズム、細胞内局在の解析

分収したがん幹細胞を用いて、細胞に取り込まれた糖鎖連結クロリン、レザフィリン®の細胞内での局在を *in vitro* で観察し、lysosome, mitochondria, Golgi body, endoplasmic reticulum などの細胞内小器官のどこに蓄積し、殺細胞効果を最終的に発揮するのか、癌細胞種による糖鎖連結クロリンの細胞内局在と殺細胞効果との関連性につき検討する。細胞内小器官は、各々 LysoTracker Green, Mito Tracker Green FM, NBD C8-ceramide, ER-Tracker Green (Invitrogen, Tokyo, Japan) でラベルし、蛍光顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡(Nikon A1 confocal system, Nikon, Japan)下に細胞内局在を観察する。

(4) 糖鎖連結クロリンによる PDT のがん幹細胞への殺細胞効果のメカニズムの解析

光線力学的療法では一般に光感受性物質が特定波長光線により励起され、細胞死を誘導するとされている。糖鎖連結クロリン、レザフィリン®を投与後、660nm の赤色半導体レーザー(LED660DL, Optocode Corporation, Tokyo, Japan)を 16 J/cm² 照射し、reactive oxygen species (ROS) detection reagent (carboxy-H₂ DFFDA) (Invitrogen), Anti-LC3 (MBL, Nagoya, Japan), Caspase-3 FITC (MBL), PI でラベルし FACS Calibur (BD Biosciences, Tokyo, Japan)にて活性酸素の誘導、オートファジー、アポトーシス、ネクローシスを検討する。

4. 研究成果

(1) ヒト大腸癌細胞株である HT29, HCT116, ヒト胃癌細胞株である MKN45, NUGC4 を用いて、CD133, CD44 により FACS Aria (BD Biosciences) でがん幹細胞を分収した。

(2) 細胞内小器官局在マーカーと共焦点レーザー顕微鏡により糖鎖連結クロリンの細胞内局在を確認したところ、ミトコンド

リア・ゴルジ体・小胞体・ライソソームのすべてに局在を示したがゴルジ体にもっとも強い局在を示した。(図1)

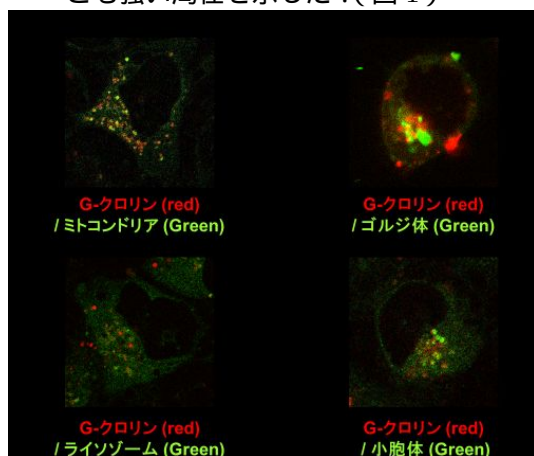


図1. 糖鎖連結クロリンの局在

- (3) 細胞内への取り込みは、がん幹細胞においても投与後経時的に上昇した。糖鎖連結クロリンはレザフィリンに比べ有意に高い細胞内への取り込みを認めた。また、アポトーシス・活性酸素の誘導に関しても糖鎖連結クロリンは通常細胞と同様がん幹細胞に対しても誘導能があることを確認した。これより糖鎖連結クロリンによるPDTががん幹細胞に対して活性酸素を発生させアポトーシスを誘導させることを確認した。
- (4) 抗癌剤耐性株におけるがん幹細胞マーカー (CD133, CD44) の発現を FACS Calibur にて解析し親株と比較し発現が高いことを確認した。GLUT1, p-53, c-Myc, HIF1 の発現は親株に比べはっきりとした変化は認めなかった。(図2)

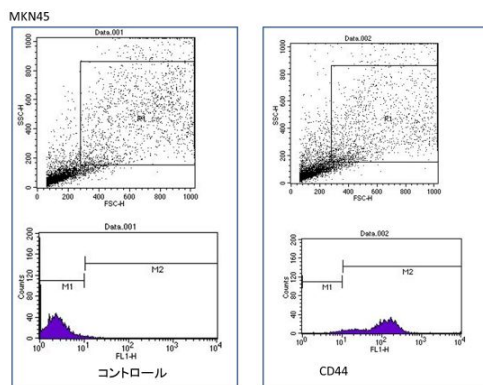


図2. 耐性株・親株のCD44の発現

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

1. Temozolomide in the Era of Precision Medicine.
Thomas A, Tanaka M.

Cancer Res. 2017 Feb 15;77(4):823-826. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2983. (査読有)

2. Maltotriose conjugation to a chlorin derivative enhances the antitumor effects of photodynamic therapy in peritoneal dissemination of pancreatic cancer.

Kato A, Tanaka M., Joh T.

Mol Cancer Ther. 2017 Mar 14. pii: molcanther.0670.2016. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0670. (査読有)

3. Immunogenic cell death due to a new photodynamic therapy (PDT) with glycoconjugated chlorin (G-chlorin).

Tanaka M. Oncotarget. 2016 Jul 26; 7 (30): 47242-51. doi: 10.18632/oncotarget.9725. (査読有)

[学会発表](計6件)

田中 守, 新規光感受性物質である糖鎖連結クロリンによる光線力学的診断の開発

第11回日本消化管学会総会学術集会
2015年2月13日 京王プラザホテル(東京都 新宿区)

Mamoru Tanaka, Immunogenic death of cells treated with new photodynamic therapy (PDT) with glucose-conjugated chlorin (G-chlorin)
The 8th Japan & US Collaboration Conference in Gastroenterology (JUCC)

2014年11月21日, インターコンチネンタル東京ベイ(東京都 港区)

田中 守, 新規光感受性物質である糖鎖連結クロリンによる抗腫瘍免疫増強メカニズムの検討

第25回日本消化器癌発生学会総会
2014年11月13日, 福岡日航ホテル(福岡県・福岡市)

田中 守, 糖鎖連結クロリンを用いた新規光線力学的がん診断法

第72回日本癌学会 学術総会
2014年9月26日, パシフィコ横浜(神奈川県 横浜市)

Mamoru Tanaka, Novel photodynamic therapy with glucose conjugated chlorin for GIST

23th EACR European Association for

Cancer Research

2014年7月7日,ミュンヘン(ドイツ)

田中 守,消化管癌に対する新規光療法
における抗腫瘍免疫増強メカニズムの
検討

第100回日本消化器病学会総会

2014年5月14日,東京国際会議場(東
京都 江東区)

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 守 (TANAKA, Mamoru)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・臨
床研究医

研究者番号: 80617861